

BAB III

MATERI DAN METODE

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari s/d Febuari 2017. Pembuatan dekok daun sirih merah (*Piper crocatum*), pembiakan bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan uji daya hambat bakteri tersebut dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Saintek Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.2.1 Materi Penelitian

Penelitian ini menggunakan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* yang dikembangkan dalam media NA (*Nutrien Agar*) yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Saintek Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim. Daun sirih merah (*Piper crocatum*) diperoleh dari Desa Doko, Kecamatan Kesamben, Kabupaten Blitar.

Alat yang digunakan dalam pembuatan dekok daun sirih merah diantaranya adalah timbangan analitik, gelas ukur, spatula, kain *flanel*, pisau dan *waterbath*. Alat yang digunakan untuk penelitian adalah *autoklaf*, *inkubator*, *erlenmeyer*, kertas cakram, pinset, jangka sorong, *spiritus*/bunsen, plastik *wrap*, cawan petri, gelas media, aluminium foil, tissue dan kertas label. Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah *aquadest*, dekok daun sirih merah (*Piper crocatum*.), iodin dan media NA (*Nutrient Agar*).

3.2.2 Alat

- | | |
|-----------------------|----------------------|
| 1. Gunting | 15. Kapas |
| 2. Oven | 16. Cawan petri |
| 3. Grinder | 17. Tube ukuran 2 mL |
| 4. Aluminium foil | 18. Mikro pipet |
| 5. Timbangan analitik | 19. Pinset |
| 6. Botol sampel | 20. Plastik wrap |
| 7. Kompor | 21. Blue tip |
| 8. Termometer | 22. Autoklaf |
| 9. Panci | 23. Kertas lebel |
| 10. Tissue | 24. Jangka sorong |

- | | |
|------------------------------------|------------------------------|
| 11. Beaker glass ukur 200 MI | 25 Elemenyer ukuran 500 MI |
| 12. Tube ukuran 15 MI | 26. Kawat ose |
| 13. Kertas saring whatman nomor 40 | 27. Lampu spirtus atau busen |
| 14. Gelas ukur 100 MI | |

3.2.3 Bahan

1. Dekok daun sirih merah (*Piper crocatum*)
2. Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*
3. Aquades 100ML
4. Kertas cakram
5. Alkohol 70%

3.3 Metode Penelitian

Metode penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 3 perlakuan dan 6 ulangan. Pemilihan metode ini karena media percobaan yang sudah homogen. Penentuan perlakuan dalam penelitian ini dengan rumus $t(r - 1) = 15$. Penelitian uji daya hambat bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* menggunakan dekok daun sirih merah (*Piper crocatum*.) dilakukan di Laboratorium menggunakan metode difusi cakram kertas. Penentuan diameter zona hambat dengan mengamati dan mengukur diameter zona terang yang berada dibagian luar cakram.

Perlakuan yang diberikan adalah sebagai berikut :

P0 : Iodip 10%

P1 : Dekok sirih merah dengan perebusan 30 menit

P2 : Dekok sirih merah dengan perebusan 60 menit

3.4 Tahapan Penelitian

3.4.1 Prosedur Pembuatan Dekok Daun Sirih Merah

1. Daun sirih merah yang telah dipersiapkan dicuci terlebih dahulu hingga bersih.
2. Daun sirih merah yang sudah dicuci kemudian ditiriskan hingga bebas air.
3. Daun sirih merah dipotong melintang dan membujur
4. Daun sirih merah di oven dalam suhu 60°C selama 24 jam
5. Daun kering dihaluskan dengan mesin grinding sampai halus

6. Dilakukan perebusan dengan aquades 100ml dan serbuk daun sirih merah 20 gr selama 30 menit dan 60 menit
7. Setelah 60 menit dan 30 menit rebusan tersebut didinginkan.
8. Setelah dingin dekok daun dapat digunakan untuk pengujian daya hambat.

3.4.2 Prosedur Pembuatan Media Agar

3.4.2.1 Prosedur Pembuatan Nutrien Agar (NA) (Prawira, dkk., 2014)

Dielarutkan 2,8 gr nutrien agar dengan 100 ml *aquadest* kedalam erlenmeyer dan ditutup *aluminium foil*.

1. Di-steril dengan pemanas hingga mendidih.
2. Di-steril dengan *autoklaf* pada suhu 121°C selama 15 menit dan tekanan 1 atm.
3. Media dituangkan ke cawan petri masing–masing 10 ml.
4. Dibiarkan dingin hingga menjadi gel.

3.4.2.2 Prosedur Pembuatan Nutrien Broth (NB) (Prawira, dkk., 2014)

1. Dilarutkan 1,3 g *nutrien broth* dengan 100 ml *aquadest* kedalam erlenmeyer dan ditutup *aluminium foil*.
2. Di-steril dengan pemanas hingga mendidih lalu dimasukkan ke tabung reaksi masing–masing 5 ml, kemudian ditutup dengan kapas dan *aluminium foil*.
3. Di-steril dengan *autoklaf* pada suhu 121°C selama 15 menit dan tekanan 1 atm.

3.4.3 Pemiakan Bakteri (Prawira, dkk., 2014)

Pemiakan Bakteri *Stahylococcus aureus* dan *Escherichia colli* dilakukan dengan cara di-*inokulasi* ke medium cair (*nutrien broth*) dengan menggunakan *spet volume* sebanyak 1 ml bakteri. Setelah itu di-*inkubasi* selama 24 jam dengan suhu 37°C.

3.4.4 Uji Daya Hambat (Prawira, dkk., 2014)

Uji daya hambat menggunakan metode *difusi* cakram kertas. Disiapkan 8 cawan petri yang telah di dituangi media padat kemudian ditambahkan 0,1 ml bakteri aktif media cair NB. Diratakan dengan *spreader* (metode sebar) sampai mengering. Kemudian *cakram disk* dicelupkan pada masing-masing perlakuan lama perebusan dekok daun sirih merah. *Cakram disk* hasil celupan tersebut dianginkan agar kering dan diletakkan pada permukaan media NA Setelah

itu media tersebut diinkubasi selama 24–48 jam pada suhu 37°C. Pengamatan dilakukan dengan melihat zona hambat/zona bening disekeliling paper *disk* yang menunjukkan daerah hambatan pertumbuhan bakteri.

Tabel 1. Kategori Penghambatan Antimikroba Berdasarkan Diameter Zona Hambat

Diameter (mm)	Respon Hambatan Pertumbuhan
0-3	Lemah
3-6	Sedang
>6	Kuat

Sumber: Pan, Chen, Tang and Zhao (2009)

3.4.5 Pengukuran Diameter Zona Hambat

Adanya zona bening di sekitar daerah sumuran merupakan anti bakteri. Simorangkir, Sitepu, dan Simanjutak (2013) menjelaskan tentang pengukuran diameter zona hambat adalah sebagai berikut:

1. Diukur zona hambat maksimum.
2. Diukur diameter zona hambat minimum.
3. Masing-masing hasil pengukuran dikurangi diameter kertas cakram sebesar 0,6 mm.
4. Hasil pengurangan dengan diameter kertas cakram lalu dirata-rata.

Perhitungan diameter koloni pada cawan petri menurut Zahara, Muhammad, dan Fifi (2013) adalah sebagai berikut:

$$\frac{d1 + d2}{2} - 6$$

Keterangan:

d1 = diameter vertical koloni bakteri ditumbuhkan pada media

d2 = diameter horizontal koloni bakteri ditumbuhkan pada media

X = diameter kertas cakram (0,6 mm)

3.5 Variabel Penelitian

Varibel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

- a. Variabel Bebas

Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah dekok daun sirih hijau dengan berbagai lama perebusan yaitu 30 menit dan 60 menit

b. Variabel Terikat

Variabel terikat yang digunakan dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat yang berupa zona bening yang terbentuk pada permukaan medium antar dekok daun sirih merah (*Piper crocatum*) dengan bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan membandingkan besarnya diameter yang terbentuk terhadap suhu perebusan dekok yang digunakan.

3.6 Analisis Data

Penelitian ini menggunakan 3 perlakuan dan 6 ulangan, rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Data yang diperoleh dianalisis menggunakan analisis ragam (ANOVA). Jika berbeda nyata dilakukan uji Jarak Berganda Duncan (JBD) untuk mengetahui perbedaan pada tiap perlakuannya.

Penentuan perlakuan dengan menggunakan rumus :

$$t(r - 1) = 15$$

Keterangan :

t = perlakuan dalam penelitian

r = ulangan dalam penelitian

Model umum percobaan dalam rancangan acak lengkap adalah sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$$

Keterangan:

i = Perlakuan

j = Ulangan

i,j = 1, 2, 3....., n

Y_{ij} = Pengamatan pada perlakuan ke-i ulangan ke-j

μ = Rataan umum

τ_i = Pengaruh perlakuan ke-i

ϵ_{ij} = Galat percobaan perlakuan ke-i ulangan ke-j

3.7 Batasan Istilah

Mastitis : Radang pada kelenjar susu (*mamae*)

Antibiotik	: Segolongan molekul, baik alami maupun sintetis, yang mempunyai efek menekan atau menghentikan suatu proses biokimia di dalam organisme, khususnya dalam proses infeksi oleh bakteri.
Dekok	: Salah satu ekstraksi dengan cara panas menggunakan pelarut air pada suhu 30°C sampai titik didih dengan waktu yang lebih lama dari infus (≥ 30 menit).
Uji Daya Hambat	: Suatu metode untuk menentukan tingkat kerendahan bakteri terhadap zat anti bakteri dan untuk mengetahui senyawa murni yang memiliki aktifitas anti bakteri.
Metode Cakram Kertas	: Metode yang digunakan untuk mengetahui diameter zona hambat pertumbuhan bakteri dengan menggunakan kertas saring.
Zona Bening	: Area yang menunjukkan daerah hambatan pertumbuhan bakteri pada media agar.